

# CB1/ $\beta$ -Arrestin /CHO

## CBP71391

### 操作说明书



4008-750-250

## 目录



1. 背景信息 .....	1
2. 产品介绍 .....	1
3. 细胞基本信息 .....	3
4. 主要仪器试剂耗材 .....	3
5. 细胞培养 .....	3
5.1 细胞复苏 .....	3
5.2 细胞传代 .....	4
5.3 细胞冻存 .....	4
6. 细胞实验流程 .....	4
6.1 激动剂检测 .....	4
6.2 拮抗剂检测 .....	5
7. 数据展示 .....	6
8. 相关产品 .....	7

## 1. 背景信息

大麻素受体属于具有 7 次跨膜结构的视紫红质样 G 蛋白耦联受体家族，有 CB1R 和 CB2R 两种亚型，7 段跨膜区域(TM<sub>s</sub>1)由三段胞外环(ELs)和三段胞内环(ILs)连接。CB1 由基因 CNR1 编码，在人类中由 472 个氨基酸组成（在大鼠和小鼠中为 473 个氨基酸），这些物种之间的氨基酸同源性达到 97 - 99%，CB1 受体主要存在于大脑，但在脾脏、肺、胸腺、心脏和血管中也有表达。CB1 通过大麻素及其衍生物刺激或结合，激活胞内信号，介导 ECS 发挥广泛而复杂的生物学作用。CB1 做为 G 蛋白偶联受体（GPCR）在大麻素等配体的作用下，主要通过激活下游 Gi/o 和  $\beta$ -arrestin 这两类信号来发挥功能。由于大麻素受体组织分布的多样性，人体内源性大麻素（CB）信号系统通过激活 G 蛋白偶联的 CB1 受体参与许多重要的生理病理过程，因此大麻素受体 CB1 做为重要的药物开发靶点，被用于针对包括肥胖、成瘾、精神类疾病、镇痛、糖尿病、肿瘤、心脑血管疾病、类风湿、哮喘、肝病、多发性硬化、抑郁症等多个疾病领域药物的开发。

## 2. 产品介绍

CB1 在其配体的刺激下，会招募 $\beta$ -Arrestin 并与之结合，根据此原理，科佰生物开发的 CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 报告基因细胞上稳定表达了 CB1 以及融合荧光素酶报告基因的 $\beta$ -Arrestin，当缺乏配体刺激时， $\beta$ -Arrestin 不与 CB1 结合，融合 $\beta$ -Arrestin 的荧光素酶处于失活构象，当 CB1 遭遇配体 CP-55940 刺激时，融合荧光素酶报告基因的 $\beta$ -Arrestin 被招募，使荧光素酶报告基因处于激活状态，加入其底物后发光信号增强，当待测样品阻断配体对 CB1 刺激时，报告基因发光信号又被抑制。

	Population Name	Mean , FL4-A
	CB1 / $\beta$ -Arrestin / CHO-K1+anti-CB1	3.34E5
	$\beta$ -Arrestin / CHO-K1+anti-CB1	482

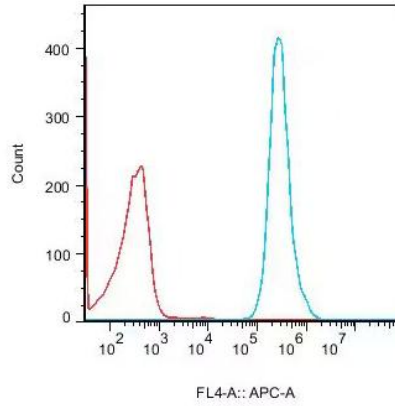


图 1: CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 细胞表达人 CB1

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制,同时具备更小的变异性和更好的可操作性,已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定,对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 CB1/ $\beta$ -Arrestin 的信号转导过程,原理见图 2 所示。

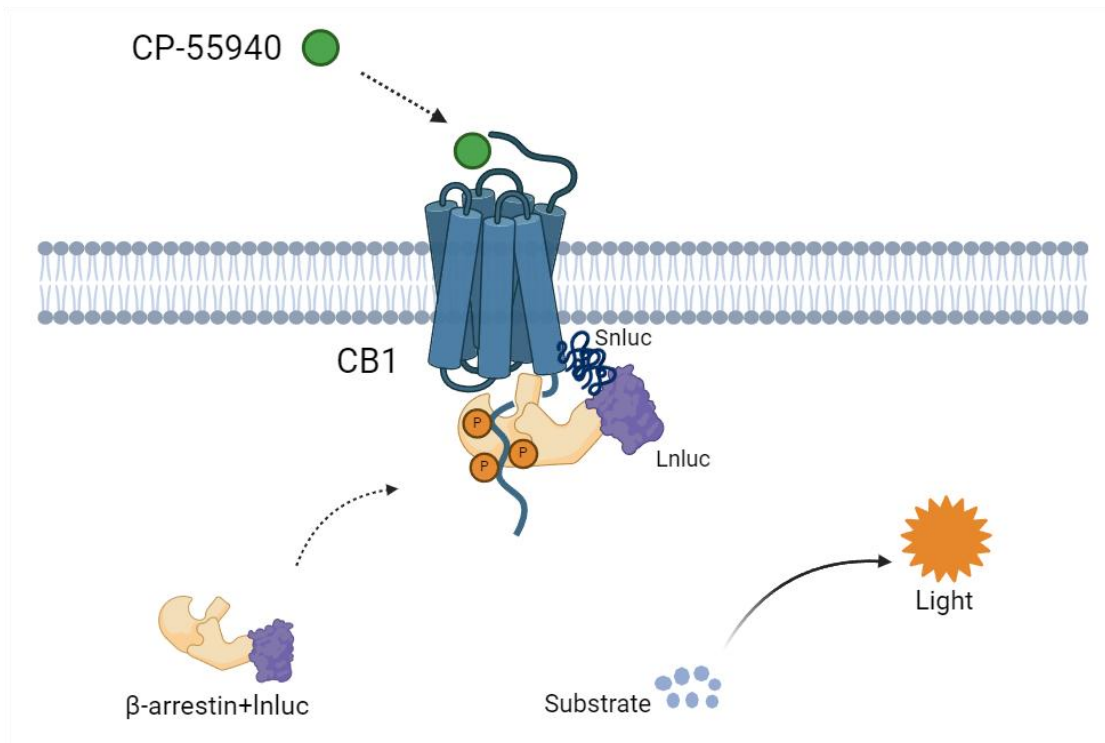


图 2: CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

传代培养基: F12k+10%FBS+5ug/ml puromycin+5ug/ml blasticidin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 贴壁

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 CB1/ $\beta$ -Arrestin 信号传导的激活剂、拮抗剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

### 4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
Human CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 完全培养基	Cobioer	CBP71391M
CP-55940	SIGMA	C1112
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
C96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack )	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/
Nano-Glo <sup>®</sup> Live Cell Assay System	Promega	Cat.No.: N2011
Opti-MEM <sup>™</sup> 减血清培养基	Gibco	Cat.No.: 51985-034

### 5. 细胞培养

#### 5.1 细胞复苏

1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻 (可能比 60 秒稍快或稍慢), 快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 完全培养基的 15ml 离心管中。

- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。
- 4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

## 5.2 细胞传代

- 1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80% 以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
- 2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

## 5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒(Nalgene 5100-0001)，加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

## 6. 细胞实验流程

### 6.1 激动剂检测

- 1) 取对数生长的 Human CB1/β-Arrestin/CHO 细胞，胰酶消化脱落并用 F12K+10%FBS 培养基终止胰酶反应，离心弃上清，用 DPBS 重悬洗涤细胞一次，继续离心弃上清，然后将细胞重悬于含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基中，将重悬的细胞密度调整为  $2.78 \times 10^5$ /ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，90ul/孔细胞悬液，37 度培养箱培养过夜。
- 3) 第二天将 10 mM CP-55940 DMSO 溶液，用 DMSO 梯度稀释，最高浓度从 1 mM 开始，三倍梯度稀释 11 个浓度，并设置 0 浓度 DMSO 对照，然后用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基将 CP-55940 梯度稀释溶液再稀释 100 倍，配制 10x CP-55940 梯度稀释溶液（10\* CP-55940 梯度溶液最高浓度为 10 μM），接下来转移梯度稀释的样品溶液 10 ul 至

- 步骤 2) 96 孔板中, 使得 96 孔板中的 CP-55940 梯度溶液终浓度达到 1x, 然后将 96 孔板放入细胞培养箱继续培养 90 分钟。
- 4) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍, 配制成 5x 检测液
  - 5) 将步骤 4) 的 96 孔板从培养箱中取出, 加入 25ul/孔 步骤 5) 中配制的 5x 检测液, 然后剧烈震荡 15 到 30 秒放入酶标仪中读取 RLU 数值。
  - 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值, 利用 Prism Graphpad 软件拟合 IL-8 对细胞激活的梯度曲线及 EC50 值。

## 6.2 拮抗剂检测

- 1) 取对数生长的 CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO 细胞, 胰酶消化脱落并用 F12K+10%FBS 培养基终止胰酶反应, 离心弃上清, 用 DPBS 重悬洗涤细胞一次, 继续离心弃上清, 然后将细胞重悬于含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基中, 将重悬的细胞密度调整为  $3.125 \times 10^5/\text{ml}$ 。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中, 80ul/孔细胞悬液, 37 度培养箱培养过夜。
- 3) 第二天根据 CB1 抗体浓度, 用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基配制 10\*梯度稀释溶液, 共设置 10 个浓度梯度, 并设置 0 浓度培养基对照孔, 取梯度稀释样品加入步骤 2) 的 96 孔板中 (10 ul/孔, 只加 1 到 10 列, 11,12 列加入等体积的培养基), 37 度培养箱孵育 30 分钟。
- 4) 用含 2%FBS 的 Opti-MEM™ 减血清培养基配制 10\*EC90 浓度的 CP-55940 加入步骤 3) 的 96 孔板中 (10 ul/孔, 只加 1 到 11 列, 12 列加入等体积的培养基做为不加配体刺激的阴性对照孔), 然后将 96 孔板放入细胞培养箱继续培养 90 分钟。
- 5) 将 Nano-Glo® Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo® Live Cell Substrate 用 Nano-Glo® LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍, 配制成 5x 检测液
- 6) 将步骤 4) 的 96 孔板从培养箱中取出, 加入 25ul/孔 步骤 5) 中配制的 5x 检测液, 然后剧烈震荡 15 到 30 秒放入酶标仪中读取数值。

7) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，计算对应每个孔样品的抑制率，然后根据计算的抑制率及对应的样品浓度，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞抑制的梯度曲线及 IC50 值(IC50 定义为化合物抑制率 50%时对应的化合物浓度)。

8) %Inhibition =  $[1 - (\text{待测化合物孔值} - \text{阴性对照孔平均值}) / (\text{DMSO 对照孔平均值} - \text{阴性对照孔平均值})] * 100$

## 7.数据展示

**Dose response of CP-55940 in CB1  $\beta$ -Arrestin CHO-K1 Cell Line (C2)**

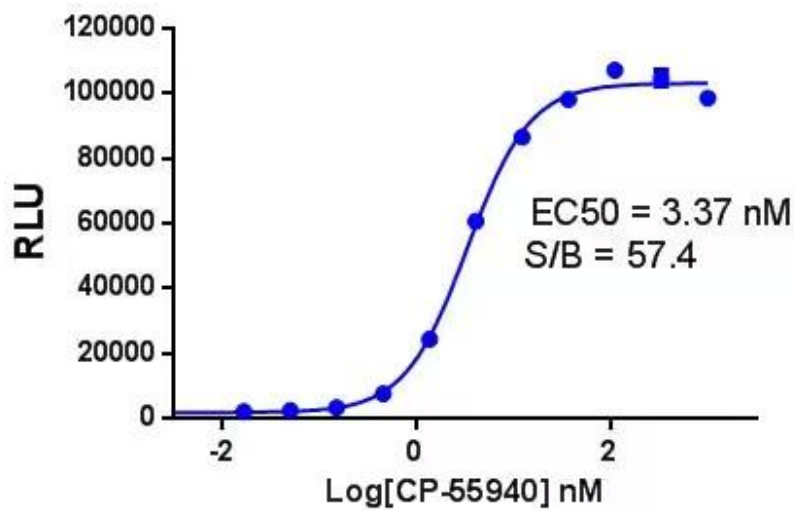


图 3: Dose response of CP-55940 in CB1  $\beta$ -Arrestin CHO-K1 Cell Line (C2)

**Inhibition of CP-55940-induced Beta-Arrestin Recruitment in CB1 Beta-Arrestin CHO-K1 Cells (C2)**

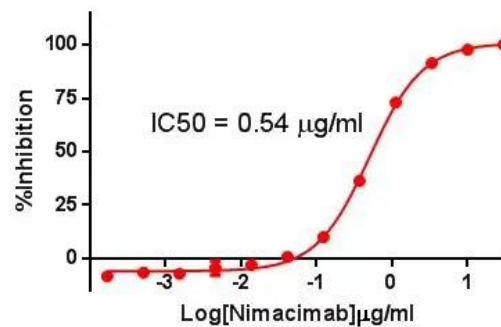


图 4: Inhibition of CP-55940-induced Beta-Arrestin Recruitment in CB1 Beta-Arrestin CHO-K1 Cells

(C2)



## 8.相关产品

名称	货号
CB1/CHO	CBP71356
CB1/ $\beta$ -Arrestin/CHO	CBP71391
CB2/CHO	CBP71366